Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 19, No. 1, Mar- Apr 2023, p. 181-194

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۹، شماره ۱، فروردین - اردیبهشت ۱۴۰۲ ص.۱۹۴-۱۸۱

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir
Research Paper

Optimization of Antioxidant Peptides Production from Tryptic Hydrolysis of Pomegranate Seed Protein

M. Rahimipanah[1], A. Sadeghi Mahoonak[2*], M. Ghorbani[3], H. Shahiri Tabarestani[4], M. Nabimeybodi[5]

Received: 2022.05.20
Revised: 2022.06.10
Accepted: 2022.06.15
Available Online: 2022.06.15

How to cite this article:
Rahimipanah, M., Sadeghi Mahoonak, A., Ghorbani, M., Shahiri Tabarestani, H., & Nabimeybodi, M. (2023). Optimization of antioxidant peptides production from tryptic hydrolysis of pomegranate seed protein. *Iranian Food Science and Technology Research Journal* *19*(1): 181-194. (In Persian with English abstract). http://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.76797.1174.

Introduction

High levels of free radicals can damage biomolecules and eventually cause oxidative stress. Bioactive peptides produced during enzymatic hydrolysis keep high health properties, such as antioxidant properties. The production of antioxidant peptides has received much attention as a new generation of natural antioxidants. Plants are one of the most abundant sources of biopolymers, especially protein. As long as the protein structure is intact, its amino acid sequence is inactive; however, during proteolysis, fermentation, and gastrointestinal digestion, these amino acids are released as oligopeptides ordinally with less than 20 amino acids and below 10 kDa in molecular weight. These peptides are more digestible and can exhibit specific bioactive properties such antioxidant properties. In this regard, the use of food waste containing protein to produce bioactive peptides and increase their value has received increasing attention. Enzymatic hydrolysis can increase their functional properties by converting proteins into peptides without affecting their nutritional value. Pomegranate seed protein is a by-product of the pomegranate seed oil industry and can be a good source of bioactive peptides with antioxidant properties. According to our knowledge, there isn't any data about the enzymatic hydrolysis of pomegranate seed protein for antioxidant peptides production. In this study, the optimal conditions for enzymatic hydrolysis of pomegranate seed protein with trypsin using the responses surface method and the effect of hydrolysis on protein structure were investigated.

Materials and Methods

In this study, the protein was extracted from pomegranate seed, and using trypsin the optimization of enzymatic hydrolysis conditions of protein was determined by Face-Centered Central Composite design, which is one of the responses surface design methods. The effect of independent variables including temperature (30 to 45 °C), time (30 to 180 minutes), and enzyme to substrate ratio (1 to 3 w/w) on DPPH free radical scavenging activity and Fe^{+3} reducing power as responses, was evaluated. Validation tests were performed for confirmation of the proposed values by software and the degree of hydrolysis of the samples was determined. In the next step, the unhydrolyzed and hydrolyzed protein was evaluated for molecular weight distribution and their surface hydrophobicity was compared. Finally, scanning electron microscopy images were used to confirm the hydrolysis process.

Results and Discussion

Under optimal conditions obtained from the response surface method (temperature: 37.6 °C, time: 136.55 minutes, and enzyme to substrate ratio: 2.2%), trypsin-derived hydrolyzate, showed DPPH free radical scavenging power: 87±0.89% and Fe^{+3} reduction power: 0.293±0.44. Under these conditions, the degree of hydrolysis was equal to 30.1±1%. The optimum conditions of hydrolysis were validated by RSM. The increase in the surface hydrophobicity of

---

1, 2, 3 and 4- Ph.D Student, Professor, Associate Professor and Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: sadeghiaz@gau.ac.ir)
5- Assistant Professor, Traditional Pharmacy and Pharmaceutical Sciences Research Center, Faculty of Pharmacy, Shahid Sadooghi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
DOI: 10.22067/ifstrj.2022.76797.1174

the protein after the hydrolysis process indicated the unfolding of the pomegranate seed protein chain and the exposure of its structure during the reaction. The electrophoretic profile of denatured pomegranate seed protein showed smaller peptide bands and lower band intensity, along with losing some of the peptide fractions after hydrolysis. so the efficacy of trypsin at cleaving the protein was confirmed. Evaluation of images obtained by scanning electron microscopy showed that unhydrolyzed protein had complex structures comprised of random sheets of different sizes and shapes and the protein degraded into small fragments and looser structure with many folds after enzyme hydrolysis, resulting in smaller particles compared with untreated samples with the same SEM parameters

Conclusion

Considering the consumer's tendency toward functional foods and present concerns about the application of synthetic additives and according to the results, the hydrolyzed pomegranate seed protein prepared by trypsin shows good antioxidant capacity. In addition, there will be a reduction in waste generated by the pomegranate processing industry. Further studies will need for the isolation and identification of the specific peptides and amino acid sequences and the evaluation of their possible incorporation in food matrices.

Keywords: Enzymatic hydrolysis, Pomegranate seed, Scanning electron microscopy (SEM), SDS-PAGE electrophoresis, Surface hydrophobicity

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 19, No. 1, Mar- Apr 2023, p. 181-194

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۹، شماره ۱، فروردین- اردیبهشت ۱۴۰۲ ص. ۱۹۴-۱۸۱

مقاله پژوهشی

تعیین شرایط بهینه تولید پپتیدهای ضداکسایش حاصل از هیدرولیز تریپتیکی پروتئین هسته انار

مریم رحیمی پناه[۱]- علیرضا صادقی ماهونک[۲*]- محمد قربانی[۳]- هدی شهیری طبرستانی[٤]- محسن نبی میبدی[٥]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۳۰
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۳/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۲۵

چکیده

این مطالعه به بررسی شرایط بهینه برای هیدرولیز آنزیمی پروتئین هسته انار با استفاده از روش سطح پاسخ و تاثیر هیدرولیز بر ساختار پروتئین می‌پردازد. در ابتدا استخراج ایزوله پروتئین صورت گرفت، سپس بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز پروتئین با استفاده از آنزیم تریپسین و طرح مرکب مرکزی تعیین شد. تاثیر متغیرهای مستقل شامل دما (۳۰ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد)، زمان (۳۰ تا ۱۸۰ دقیقه) و نسبت آنزیم به سوبسترا (۱ تا ۳ درصد وزنی/وزنی) بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH و قدرت کاهندگی یون فریک به عنوان پاسخ‌های این روش مورد ارزیابی قرار گرفتند. در شرایط بهینه به دست آمده از روش سطح پاسخ (دما: ۳۷/۶ درجه سانتی‌گراد، زمان: ۱۳۶/۵۵ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترا: ۲/۲ درصد)، هیدرولیزهای مشتق شده، از قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH (به میزان ۰/۸۹±۸۷ درصد) و توان کاهندگی یون فریک (به میزان ۰/۴۴±۰/۲۹۳) برخوردار بودند. در این شرایط، درجه هیدرولیز پروتئین برابر با ۱±۳۰/۱ درصد بود. افزایش در میزان آبگریزی سطحی پروتئین پس از فرآیند هیدرولیز نشان‌دهنده باز شدن زنجیر پروتئینی هسته انار و آشکار شدن ساختار آن در طی واکنش بود. با استفاده از روش الکتروفورز، وجود پپتیدهایی با وزن مولکولی کم (کمتر از ۱۱ کیلودالتون) تایید شد. ارزیابی تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان‌دهنده بازشدن ساختار پروتئین و تولید قطعات کوچک‌تر در پی اعمال تیمار آنزیمی بود. طبق نتایج به‌دست آمده پروتئین هیدرولیز شده هسته انار توسط آنزیم تریپسین از قابلیت ضداکسایشی مناسبی برخوردار است.

واژه‌های کلیدی: آبگریزی سطحی، الکتروفورز، میکروسکوپ الکترونی روبشی، هسته انار، هیدرولیز آنزیمی

مقدمه

پروتئین یک ترکیب مغذی مهم و منبع اسیدهای آمینه ضروری است. علاوه بر ویژگی‌های تغذیه‌ای اساسی، بعضی از پروتئین‌ها می‌توانند با آزادسازی پپتیدهای زیست فعال داخل توالی خود، اثرات سلامتی‌بخش بیشتری داشته باشند (Chalamaiah *et al*., 2017). تا زمانی که ساختار پروتئین دست نخورده باشد، توالی آمینواسیدهای آن غیرفعال هستند ولی طی پروتئولیز، تخمیر و هضم معده-روده‌ای، این آمینواسیدها به‌صورت پپتیدهای کوتاه زنجیر با کمتر از ۲۰ آمینواسید و وزن مولکولی حداکثر ۲۰ کیلو دالتون، آزاد می‌شوند (Aluko, 2015). پپتیدهای با وزن مولکولی کم نسبت به پروتئین‌ها، هضم پذیری راحت‌تر و زیست دسترسی بیشتری برای انواع عملکردهای بیولوژیکی بدن انسان دارند و بطور کلی فعالیت زیستی بیشتری نسبت به پروتئین اصلی نشان می‌دهند. هیدرولیزشده‌های پروتئینی، فعالیت‌های زیستی مختلفی مانند خصوصیات آنتی‌اکسیدانی، ضد دیابت، ضد پرفشاری خون، ضد میکروبی، ضد التهاب، کاهش کلسترول خون، شلاته کننده فلزات، ضدسرطان، افزایش رشد و بهبود ایمنی را نشان داده‌اند. هیدرولیز آنزیمی یکی از راه‌های بهبود ویژگی‌های عملکردی بدون ایجاد اثر منفی بر ارزش تغذیه‌ای

۱، ۲، ۳ و ۴- به‌ترتیب دانشجوی دکتری استاد، دانشیار و استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: sadeghiaz@gau.ac.ir)
۵- استادیار مرکز تحقیقات علوم دارویی و داروسازی سنتی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

DOI: 10.22067/ifstrj.2022.76797.1174

پروتئین‌هاست. همچنین، تهیه پپتید می‌تواند در تبدیل پروتئین‌های غذایی بدون کاربرد و حاصل از فرایند، به محصولات ارزشمند، که بسیار مورد علاقه شرکت‌های غذایی می‌باشد کمک کند (Hall *et al*., 2018; Xie *et al*., Chalamaiah *et al*., 2017 ; 2019).

رادیکال‌های آزاد در بسیاری از سیستم‌های بیولوژیکی و شیمیایی تولید می شوند. میزان زیاد رادیکال‌های آزاد می‌تواند به مولکول‌های زیستی آسیب رسانند و در نهایت باعث استرس اکسیداتیو شوند. انواع بیماری‌ها مانند سرطان، بیماری‌های قلبی-عروقی و پیشرفت فرایند پیری با استرس اکسیداتیو ارتباط دارند. به دلیل اثرات مضر رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو در بدن، پیشگیری از این واکنش‌ها ضروری است. برخی از آنتی‌اکسیدانی‌های سنتزی مورد استفاده، اثرات جانبی نامطلوبی بر بدن دارند. بنابراین، تحقیقات بر شناسایی و استخراج ترکیبات انتی‌اکسیدانی از منابع طبیعی با پتانسیل بالای عملکردی متمرکز شده است (Kim *et al*., 2018 ; Nourmohammadi *et al*., 2017).

پژوهش‌های زیادی در زمینه استفاده از ظرفیت آنتی‌آکسیدانی موجود در هیدرولیزهای پروتئینی و یا پپتیدهای حاصل از منابع گیاهی انجام شده است. نورمحمدی و همکاران (Nourmohammadi *et al*., 2017) با بررسی شرایط بهینه هیدرولیز کنسانتره پروتئینی دانه کدو توسط تریپسین، گزارش کردند که پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو از قابلیت ضداکسایشی و شلاته‌کنندگی مناسبی برخوردار است. در پژوهشی که توسط مشگینفر و همکاران (Meshginfar *et al*., 2018) انجام شد، اثر هیدرولیز آنزیمی پروتئین هسته گوجه فرنگی را بر عملکرد و خصوصیات فیزیکوشیمیایی هیدرولیز شده‌ها بررسی گردید و نتایج نشان داد هیدرولیز آنزیمی منجر به تولید پپتیدهای با خاصیت ضداکسایش و دیگر خصوصیات عملکردی می‌شود. ژی و همکاران (Xie *et al*., 2019) بیان کردند که در بین هیدرولیز شده‌های پروتئین دانه ماش اجزاء کمتر از ۳ کیلودالتون که غنی از آمینواسیدهای آروماتیک و آب گریز است، نسبت به بقیه اجزاء دارای بهترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند. در تحقیق دیگری رنجبر ندامانی و همکاران (Ranjbar Nadamani *et al*., 2020) شرایط بهینه هیدرولیز آنزیمی پروتئین نخود کاجان را به روش سطح پاسخ تعیین کردند و نشان داده شد که می‌توان از پروتئین‌های هیدرولیز شده نخود کاجان به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی و منبع آمینواسیدهای ضروری استفاده کرد. در یک بررسی ملوف و همکاران (Maluf *et al*., 2020) شرایط بهینه هیدرولیز آنزیمی پروتئین موجود در ضایعات حاصل از جگر خوک، به روش سطح پاسخ را تعیین کردند و سپس با تکنیک الکتروفورز SDS-PAGE وجود پپتیدهای با وزن مولکولی کمتر از ۱۴ کیلودالتون که نشان دهنده تشکیل ترکیبات فعال زیستی است، تایید شد. فتحی و همکاران (Fathi *et al*., 2022) شرایط بهینه هیدرولیز آنزیمی پروتئین تفاله زیتون با آنزیم تریپسین را تعیین کردند و نشان دادند این آنزیم در تولید هیدرولیزات با خاصیت ضداکسایش موثر است.

انار با نام علمی *Punica granatum* L. در سطح وسیعی در خاورمیانه بخصوص ایران کاشت می‌شود. ایران تقریبا ۴۷ درصد کل انار دنیا را تولید می‌کند (Derakhshan *et al*., 2018). دانه آبگیری شده (هسته) انار، محصول جانبی فرآیندهای انار است و حدود ۲۰/۵۵-۹/۴۴ درصد وزن کل میوه را به خود اختصاص می‌دهد (Tehranifar *et al*., 2010). پروتئین هسته انار غنی از اسیدهای‌آمینه ضروری است. بنابراین، پروتئین هسته انار می‌تواند به‌عنوان منبع پروتئینی برای تغذیه انسان استفاده شود (Talekar *et al*., 2018).

تولید هیدرولیزهای پروتئینی دارای خواص آنتی‌اکسیدانی منجر به ارتقای ارزش محصولات جانبی حاصل از فرآوری استخراج روغن هسته انار می‌شوند. براساس اطلاعات موجود، تاکنون تحقیقی در زمینه هیدرولیز پروتئین هسته انار توسط پروتئاز صورت نگرفته است؛ لذا در این تحقیق سعی می‌شود شرایط بهینه هیدرولیز پروتئین هسته انار جهت تولید پپتیدهایی با بیشترین اثر مهارکنندگی رادیکال DPPH و احیا کنندگی یون فریک توسط آنزیم تریپسین مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

کنجاله هسته انار حاصل از صنایع تولید روغن با روش پرس سرد از شرکت نیری ارگانیک یزد خریداری شد. آنزیم تریپسین پانکراتیک خوکی با فعالیت ۱۵۰۰ واحد در میلی‌گرم از شرکت سیگما-آلدریچ خریداری شد. کلیه مواد شیمیایی از برندهای معتبر تهیه شدند و از درجه آزمایشگاهی برخوردار بودند.

تهیه پودر بدون چربی از کنجاله هسته انار

در ابتدا کنجاله‌ها توسط آسیاب الکتریکی به پودر تبدیل و از الک با مش ۳۵ عبور داده شدند. پودر کنجاله هسته انار به منظور جداسازی کامل چربی موجود در آن، با حلال هگزان با خلوص بیش از ۹۵ درصد به نسبت ۱:۳ وزنی-حجمی مخلوط و به مدت ۳ ساعت با استفاده از شیکر همزده و چربی‌گیری شد. سپس هگزان جدا شد و پودر چربی‌گیری شده به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق خشک شد. در نهایت آرد چربی گیری شده تا مرحله استخراج پروتئین در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Singh *et al*., 2018).

تعیین الگوی حلالیت پروتئین کنجاله هسته انار بر اساس pH

در این پژوهش استخراج پروتئین به روش حلالیت قلیایی و ترسیب اسیدی صورت گرفت. به منظور استخراج بیشترین میزان پروتئین، الگوی حلالیت پروتئین کنجاله هسته انار در pHهای مختلف بررسی شد (Nioi *et al.*, 2012). به منظور تعیین الگوی حلالیت، سوسپانسیون‌هایی از کنجاله چربی‌گیری شده در آب مقطر با نسبت ۱:۲۰ (وزنی/حجمی) تهیه شد. سوسپانسیون حاصل به مدت یک ساعت در دمای اتاق مخلوط، سپس pH سوسپانسیون توسط هیدروکسید سدیم و اسید کلریدریک یک نرمال در ۱۰ سطح (۱-۱۰) تنظیم و به مدت ۶۰ دقیقه در pH ثابت مخلوط شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و g ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد، سوپرناتانت حاصل از کاغذ صافی عبور داده شد و سپس میزان پروتئین موجود در سوپرناتانت، به روش Bradford (۱۹۷۶) اندازه‌گیری شد. برای تهیه منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف آلبومین سرم گاوی استفاده شد.

تولید ایزوله پروتئین هسته انار

پودر هسته انار چربی‌گیری شده به نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر مخلوط و میزان قلیاییت آن با افزودن محلول هیدروکسید سدیم ۱ نرمال به pH حداکثر حلالیت رسانده و مخلوط به مدت ۱ ساعت همزده شد. سپس این مخلوط سانتریفوژ شد (g۱۰۰۰۰ و ۱۵ دقیقه) و سوپرناتانت توسط اسید کلریدریک ۱ مولار تا pH ایزوالکتریک پروتئین هسته انار اسیدی گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط همزده و مجدد سانتریفوژ شد. پروتئین‌های رسوب کرده از بخش مایع جدا و با آب مقطر دو بار شسته شدند. کنسانتره پروتئینی حاصل جمع آوری و توسط خشک کن انجمادی خشک گردیدند و تا زمان انجام آزمون‌ها در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Houde *et al.*, 2018).

تهیه پروتئین هیدرولیز شده

پروتئین استخراج شده هسته انار به طور دقیق در ارلن‌های حجمی توزین و با بافر پتاسیم فسفات (۲۰ میلی‌مولار، pH=8) سوسپانسیون ۵٪ وزنیـ حجمی تهیه و امکان هیدراته شدن کامل آن در حین همزدن مداوم به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط فراهم گردد. طبق طرح آماری، پس از رسیدن دمای انکوباتور شیکردار به دمای مورد نظر نمونه‌ها درون انکوباتور قرار داده شده و پس از ثابت شدن دما، آنزیم تریپسین به محلول اضافه شد و هیدرولیز در شرایط همزدن مداوم (۲۰۰ rpm) انجام گردید. پس از اتمام فرآیند هیدرولیز، غیرفعال کردن واکنش و آنزیم از طریق اعمال حرارت ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه توسط حمام آب گرم صورت گرفت. پس از آن محلول تا دمای محیط خنک گردید. سپس محلول هیدرولیز شده تحت نیروی گریز از مرکز با دور g۶۵۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت و مایع رویی به عنوان ترکیب هیدرولیز شده‌ی پروتئینی جمع‌آوری و جهت انجام آزمون‌های بعدی با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی به مدت ۴۸ ساعت، در فشار ۰/۰۱۷ میلی پاسکال و دمای ۵۷- درجه سانتی‌گراد خشک گردید (Nourmohammadi *et al.*, 2017).

طراحی آزمایش به منظور بهینه سازی شرایط استخراج

با هدف دستیابی به شرایط بهینه هیدرولیز از نرم‌افزار Design Expert و روش سطح پاسخ با طرح مرکب مرکزی استفاده شد. فاکتورهای موثر بر فرآیند هیدرولیز توسط آنزیم تریپسین شامل دما (X_1)، زمان (X_2) و نسبت آنزیم به سوبسترا (X_3) به عنوان متغیرهای مستقل در سه سطح (۱+، ۰، ۱-) و دو متغیر وابسته یعنی قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH (Y_1) و قدرت کاهندگی یون فریک (Y_2) بودند. محدوده و دامنه فاکتورهای مورد بررسی بر پایه نتایج اولیه آزمایشگاهی به دست آمده، انتخاب شدند. سطوح مختلف متغیرهای مستقل در جدول ۱ نشان داده شده است.

۲۰ تیمار تصادفی توسط نرم‌افزار انتخاب شد. مدل رگرسیونی به منظور پیش‌بینی پاسخ‌های به صورت زیر ارائه شد:

$$Y= \beta_0 + \sum_{i=1}^{3} \beta_i X_i + \sum_{i=1}^{3} \beta_{ii} X_{ii} + \sum_{i=1}^{2}\sum_{j=2}^{3} \beta_{ij} X_i X_j \quad \text{(معادله ۱)}$$

در این معادله، Y نشان دهنده متغیر وابسته است، β_0 مقدار ثابت و β_i، β_{ii} و β_{ij} به ترتیب اثرات خطی، درجه دوم و اثرات متقابل می‌باشد و X_i و X_j متغیرهای مستقل را نشان می‌دهند. تجزیـه و تحلیـل رگرسیونی و واریـانس داده‌هـای آزمایـشی بـه تعیین معنی‌داری آزمون‌های آماری شرایط مـدل و نیـز ترسـیم نمودارها و بهینه‌سازی، توسـط نـرم‌افـزار صورت پذیرفت.

اندازه‌گیری فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

در این آزمون ۱ میلی‌لیتر از نمونه (غلظت۴۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) با ۱ میلی‌لیتر محلول DPPH (۱ میلی‌مولار در اتانول ۹۵٪) مخلوط شد. در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد مخلوط و۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری شد و در نهایت جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH از رابطه‌ی زیر محاسبه شد (Xie *et al.*, 2019):

درصد بازدارندگی =(۱-(جذب کنترل/جذب نمونه))×۱۰۰ (۲)

جدول ۱- متغیرهای مستقل و سطوح انتخاب شده برای آن‌ها توسط روش آماری سطح پاسخ
Table 1- Independent variables and their levels used in the RSM

متغیر مستقل Independent variables	نماد Symbol	سطوح متغیرها Coded Variable Levels -α (-1)	 0	 +α (+1)
دما (درجه سانتی‌گراد) Temperature (^{0}C)	X_1	30	37.5	45
زمان (دقیقه) Time (min)	X_2	30	105	180
نسبت آنزیم به سوبسترا (درصد وزنی/وزنی) Enzyme to Substrate Ratio (%w/w)	X_3	1	2	3

اندازه‌گیری قدرت کاهندگی یون فریک

در این روش، ۰/۵ میلی‌لیتر نمونه حل شده در آب مقطر (غلظت۴۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) با ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار (pH = 6.6) و ۰/۵ میلی‌لیتر محلول پتاسیم فری سیانید (۱٪ وزنی/حجمی) مخلوط شد. مخلوط در دمای ۵۰ درجه برای۲۰ دقیقه انکوبه شد و بعد از رسیدن به دمای اتاق، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول تری کلرو استیک اسید (۱۰٪ وزنی/حجمی) به مخلوط اضافه و به مدت۱۰ دقیقه در ۱۵۰۰g سانتریفوژ شد. در نهایت، ۱میلی‌لیتر سوپرناتانت با ۱ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۲ میلی‌لیتر محلول فریک کلراید (۰/۱٪ وزنی/حجمی) مخلوط شد و جذب نمونه در ۷۰۰ نانومتر پس از ۱۰ دقیقه نگهداری مخلوط در محیط تاریک خوانده شد. افزایش جذب مخلوط واکنش نشان دهنده افزایش قدرت احیاءکنندگی است (Mirzapour *et al.*, 2016).

تعیین درجه هیدرولیز

درجه هیدرولیز براساس میزان نیتروژن محلول در تری کلرواستیک اسید انجام گرفت (Xie *et al.*, 2019). بطور خلاصه ۱۰ میلی‌لیتر محلول پروتئین هیدرولیز شده با ۱۰ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۱۰٪ مخلوط و پس از سانتریفوژ شدن (۵ دقیقه، ۱۵۰۰ g)، نیتروژن محلول در سوپرناتانت (N_1) و نیتروژن کل (N_0) به روش بردفورد اندازه‌گیری گردید.

درصد نیتروژن محلول در تری‌کلرواستیک اسید =(N_1/N_0) ×۱۰۰ (۳)

توزیع وزن مولکولی

اندازه مولکولی پروتئین هسته انار و هیدرولیز شده‌های آن با استفاده از تکنیک الکتروفورز SDS-PAGE با ژل آکریل آمید ۱۵٪ بررسی گردید (Laemmli, 1970). در این روش نمونه‌ها (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با ۳۰ میکرولیتر بافر (بافر تریس pH = ۶/۸ با غلظت ۵۰ میلی‌مول بر لیتر، سدیم دودسیل فسفات ۴٪، بروموفنول آبی ۰/۰۱٪، گلیسرول ۲۰٪ و بتامرکاپتواتانول ۱۰٪) مخلوط و در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه حرارت داده شدند. سپس همگن و در دمای اتاق خنک شدند. در مرحله بعد ۱۰ میکرولیتر از نمونه‌های تهیه شده بر روی ژل جداکننده با غلظت ۱۵٪ قرار داده شد. بعد از اعمال جریان ثابت (۱۰۰ میلی‌آمپر) به مدت ۲ تا ۲/۵ ساعت، ژل از دستگاه جدا شد و به مدت ۲۴ ساعت با محلول رنگی کوماسی برلیانت‌بلو G-250 رنگ‌آمیزی شد. سپس، رنگ‌زدایی نمونه‌ها با استفاده از متانول ۱۵٪ و اسیداستیک ۱۰٪ انجام شد. با استفاده از نشانگرهای پروتئینی (دامنه وزنی ۱۱ تا ۱۸۰ کیلودالتون) دامنه وزن مولکولی پروتئین و پپتیدها تعیین شد.

تعیین میزان آبگریزی سطحی

برای تعیین میزان آبگریزی سطحی ۶ میکرولیتر از پروب فلورسنت 8-anilino-1-naphthalene sulfonate (ANS) با غلظت ۸ میلی‌مولار و ۳۰۰ میکرولیتر نمونه (پروتئین هسته انار و هیدرولیز شده‌های آن) دارای محدوده غلظت ۰/۰۵ تا ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (محلول در بافر فسفات ۰/۰۱ مولار و pH=7)، در پلیت۹۶ خانه مشکی با یکدیگر مخلوط شدند. پلیت به مدت ۳ دقیقه به آرامی تکان داده شد. سپس، شدت فلورسانس نسبی نمونه‌ها در ۳۶۰ و ۴۶۰ نانومتر به ترتیب به عنوان طول موج‌های تهییج و نشر با استفاده از خوانشگر میکروپلیت (Synergy™ HTX BioTek Instruments Inc.) ارزیابی و ثبت شد. شیب اولیه منحنی شدت نشر در مقابل غلظت نمونه (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) از طریق رگرسیون خطی محاسبه و به عنوان شاخص آبگریزی سطحی ارائه گردید (Kato & Nakai, 1980).

ریخت‌شناسی سطحی

با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (FEI ESEM QUANTA 200) ساختار پروتئین‌های هسته انار، قبل و پس از

فرآیند هیدرولیز آنزیمی مورد بررسی قرار گرفت. همه نمونه‌ها با لایه‌ای منفرد از طلا پوشانیده شدند. تصاویر نمونه‌ها با میکروسکوپ روبشی در ولتاژ شتاب‌دهنده ۲۰ کیلو ولت و با بزرگنمایی ۲۰۰۰ مورد ارزیابی قرار گرفت (Islam *et al*., 2021).

نتایج و بحث

حلالیت پروتئین هسته انار بر اساس pH

بر پایه نتایج به دست آمده از این مطالعه، در کنسانتره پروتئینی حاصل از هسته انار، کمترین میزان حلالیت پروتئین‌ها در pH= ۴/۴ است و با افزایش قلیائیت، حلالیت پروتئین افزایش می‌یابد. این نتایج با یافته‌های محققان که محدوده pH=۴-۵ را برای اکثر پروتئین‌های گیاهی محدوده ایزوالکتریک دانستند، مطابقت دارد. با توجه به اینکه افزایش مقدار pH جهت استخراج پروتئین، ممکن است که به اسیدآمینه‌های ضروری موجود در ساختار پروتئین صدمه بزند و سبب کاهش قابلیت هضم و ارزش زیستی پروتئین شود، استخراج پروتئین از هسته انار در pH=۱۰ صورت پذیرفت (Gerzhova *et al*., 2016; Olivares-Galván *et al*., 2020).

بهینه‌سازی هیدرولیز آنزیمی با روش سطح پاسخ

ارزیابی فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH و قدرت کاهندگی یون فریک به عنوان شاخص‌هایی جهت تائید فعالیت ضداکسندگی صورت گرفت. با توجه به نقاط تعریف شده توسط طرح آماری مورد استفاده، آزمون‌های مربوطه انجام شد. نتایج مربوط به هر تیمار در جدول ۲ نشان داده شده است.

نتایج جدول ۳ نشان می‌دهد که مدل آماری پیشنهاد شده توسط نرم‌افزار با ضریب همبستگی مناسب بصورت معنی‌داری (p<۰/۰۱) جهت پیش‌بینی اثر هر یک از متغیرهای واکنش بر میزان پاسخ مناسب قابل کاربرد است.

ضرایب رگرسیون روابط بین پاسخ‌ها و پارامترهای هیدرولیز را نشان می‌دهد و بیانگر رابطه درجه دوم متغیرها با میزان پاسخ است. شاخص عدم تطبیق مدل جهت برازش معادله مربوطه معنی‌دار نشد و بیانگر توانایی این رگرسیون خطی در پیش‌بینی میزان مناسب پاسخ می‌باشد.

جدول ۲- سطوح متغیرهای مستقل طرح مرکب مرکزی و پاسخ‌های هر تیمار

Table 2- Levels of independent variables for Central composite design and its responces

شماره تیمار Run	متغیرهای مستقل Independent variables			متغیرهای وابسته Dependent variables	
	دما Tempreture ^{0}C	زمان Time min	نسبت آنزیم به سوبسترا E/S ratio %w/w	فعالیت مهارکنندگی DPPH DPPH scavenging power	قدرت کاهندگی یون فریک Ferric reducing power
	X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2
1	45	30	1	86	0.17
2	30	180	1	86.1	0.176
3	37.5	105	2	87.1	0.243
4	30	30	1	86	0.166
5	37.5	105	2	87.4	0.291
6	37.5	30	2	87	0.282
7	45	180	3	86.7	0.19
8	37.5	105	2	87.4	0.293
9	37.5	105	2	87.3	0.284
10	37.5	105	2	87.3	0.289
11	30	105	2	86.5	0.207
12	30	30	3	86.4	0.19
13	37.5	105	3	87.1	0.26
14	45	180	1	87	0.153
15	37.5	105	1	87.1	0.265
16	45	105	2	86.3	0.191
17	37.5	105	2	87.2	0.28
18	45	30	3	85.8	0.201
19	30	180	3	86.9	0.145
20	37.5	180	2	87.2	0.255

جدول ۳- تجزیه و تحلیل واریانس مدل درجه دوم حاصل از طرح سطح پاسخ
Table 3- Analysis of variance (ANOVA) of response surface quadratic model

منبع Source	فعالیت مهارکنندگی DPPH DPPH scavenging power Y1			قدرت کاهندگی یون فریک Ferric reducing power Y2		
	مقدار F F Value	مقدار P P Value	ضریب رگرسیون Regression coefficient	مقدار F F Value	مقدار P P Value	ضریب رگرسیون Regression coefficient
مدل Model	21.75	< 0.0001		20.24	< 0.0001	
زمان Time X_1	0.040	0.8460	-0.010	0.16	0.6945	+ 0.0021
دما Temprature X_2	28.97	0.0003	+0.27	3.00	0.1138	-0.009
نسبت آنزیم به سوبسترا E/S ratio X_3	1.95	0.1931	+0.070	1.16	0.3062	+ 0.0056
دما × زمان Temprature × Time X_1X_2	8.40	0.0159	+0.16	0.023	0.8832	+ 0.0008
نسبت آنزیم به سوبسترا ×زمان E/S ratio × Time X_1X_3	14.36	0.0035	-0.21	2.61	0.1375	+0.0093
نسبت آنزیم به سوبسترا ×دما E/S ratio × Temprature X_2X_3	0.45	0.5188	+0.038	1.11	0.3163	-0.00612
$(زمان)^۲$ $(Time)^2$ X_1^2	63.73	< 0.0001	-0.76	64.58	< 0.0001	-0.080
$(دما)^۲$ $(Temprature)^2$ X_2^2	0.44	0.5209	-0.064	1.04	0.3323	-0.0100
$(نسبت آنزیم به سوبسترا)^۲$ $(E/S ratio)^2$ X_3^2	0.44	0.5209	-0.064	2.64	0.1353	-0.0161
عدم برازش Lack of Fit	2.68	0.1514		0.54	0.7448	
ضریب تبیین R-Squared	0.9514			0.9480		
ضریب تبیین تعدیل شده Adj R-Squared	0.9077			0.9011		
C.V. %	0.18			7.25		

ضرایب تغییرات کمتر از ۱۰ درصد به دست آمد که به معنای قابلیت تکرارپذیری مدل‌ها بود، بطوری‌که می‌توان از آن‌ها در جهت بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز آنزیمی استفاده کرد. ضریب تبیین بالا، معنادارنبودن ضریب عدم برازش مدل و در نهایت ضریب تبیین تعدیل شده متمایل به ۱ نشان‌دهنده صحت و اعتبار مدل‌های پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزار در جهت تفسیر رابطه بین متغیرهای مستقل و پاسخ‌ها است.

اثر پارامترهای هیدرولیز بر روی قدرت ضداکسایش

با توجه به مدل، نمودارهای سه بعدی با تغییر دو متغیر مستقل و ثابت نگه داشتن متغیر مستقل دیگر در نقطه مرکزی توسط نرم افزار ترسیم شدند و در شکل ۱ نشان داده شده‌اند.

جهت بررسی تاثیر دما بعنوان یکی از متغیرهای مستقل، در شکل ۱، a که اثر متقابل دما و زمان و b که اثر متقابل دما و نسبت آنزیم به سوبسترا بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH را نشان

می‌دهند و نیز e و d که به ترتیب اثر متقابل دما و زمان و اثر متقابل دما و نسبت آنزیم به سوبسترا بر قدرت کاهندگی یون فریک توسط هیدرولیزشده‌های پروتئین هسته انار را نشان می‌دهند، بررسی شدند. نتایج حاکی از تاثیر معنادار دما بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده هسته انار بود. نتایج حاصل از پژوهش‌های مختلف نیز نشان‌دهنده تاثیر دما بر واکنش هیدرولیز آنزیمی هستند. دمای بهینه فعالیت آنزیم بسته به نوع سوبسترا مختلف خواهد بود. از فاکتورهای موثر بر سرعت هیدرولیز آنزیمی می‌توان به پایداری آنزیم، در دسترس بودن سوبسترا و نیز تشکیل محصولات جانبی حاصل از هیدرولیز اشاره نمود (Singh *et al.*, 2018). نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که دمای بهینه انجام فرآیند هیدرولیز آنزیمی تریپسین در شرایط بیان شده، ۳۷/۶ درجه سانتی‌گراد است. کاهش فعالیت ضداکسایش در دمای پایین‌تر از ۳۷/۶ درجه سانتی‌گراد می‌تواند به دلیل هیدرولیز ناقص پروتئین‌ها باشد. بطور کلی، با افزایش دما به سبب در معرض قرارگیری پیوندهای پپتیدی و افزایش سطح تماس آنزیم تریپسین با آن‌ها سرعت هیدرولیز و در نتیجه فعالیت ضداکسایش بیشتر می‌شود. کاهش فعالیت ضداکسایش در دمای بالاتر از ۳۷/۶ درجه سانتی‌گراد می‌تواند ناشی از دناتوره شدن حرارتی پروتئین‌ها و از دست‌رفتن فعالیت مطلوب آنزیم باشد (Islam *et al.*, 2021; Singh *et al.*, 2018; Wang & Shahidi, 2018). پژوهش‌های زیادی در این زمینه انجام شده است و در بیشتر این تحقیقات از دمای ۳۰–۴۰ درجه سانتی‌گراد به عنوان دمای بهینه فعالیت آنزیم تریپسین یاد شده است (Fathi *et al.*, 2022; Jahanbani *et al.*, 2016; Mirzapour *et al.*, 2016; Zang *et al.*, 2019).

به منظور بررسی تاثیر زمان فرایند هیدرولیز بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH، شکل ۱ a و c و بر قدرت کاهندگی یون فریک نمودارهای d و f که به ترتیب تاثیر متقابل زمان و دما و تاثیر متقابل زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا را نشان می‌دهند، بررسی شدند. بررسی‌ها نشان داد که با افزایش زمان هیدرولیز، فعالیت مهارکنندگی رادیکال و توان کاهندگی یون فریک تا زمان ۱۳۶/۵۵ دقیقه افزایش داشته و سپس روند کاهشی به خود گرفت. این نتایج مشابهت زیادی با نتایج تحقیقات محققان دیگر در زمینه واکنش‌های هیدرولیز دارد. در تفسیر این موضوع بایستی که به این نکته اشاره نمود که با افزایش زمان هیدرولیز، پروتئین به پپتیدهای دارای خواص آنتی‌اکسیدانی تبدیل می‌شود و خاصیت آنتی‌اکسیدانی به طور مشخص افزایش می یابد ولی با افزایش بیش از حد زمان، این پپتیدها به پپتیدهای کوچکتر آبدوست هیدرولیز می‌شوند و این پپتیدها از توانایی کمتری در مهار رادیکال‌های آزاد آبگریز برخوردارند (Singh *et al.*, 2018; Hamzeh *et al.*, 2019).

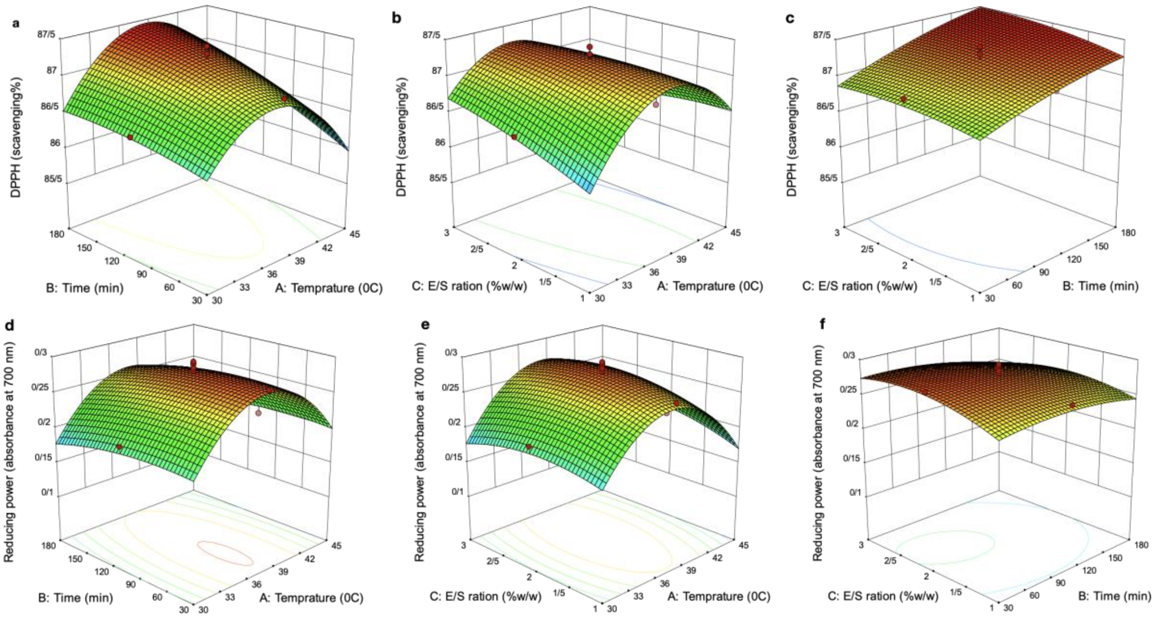
همچنین تاثیر نسبت آنزیم به سوبسترا بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد (شکل ۱ b,c) و بر قدرت کاهندگی یون فریک (شکل ۱ d,f) بررسی شد و نشان داده شد که این متغیر تا میزان ۲/۲ درصد (وزنی/وزنی)، سبب تولید هیدرولیز شده‌هایی با فعالیت آنتی‌آکسیدانی بالاتر شد. در این مورد باید اشاره شود که افزایش غلظت آنزیم منجر به افزایش میزان دسترسی مکان‌های فعال آنزیم به زنجیره پروتئینی شده و سبب تجزیه سریع‌تر پروتئین و شکسته شدن پیوندهای پپتیدی آن می‌شود (Kurozawa *et al.*, 2008). در ادامه مشاهده شد که با افزایش بیشتر از ۲/۲ درصد نسبت آنزیم به سوبسترا (وزنی/وزنی)، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی از افزایش معناداری برخوردار نشد. چنین حالتی می تواند ناشی از هیدرولیز بیش از حد باشد که احتمال تماس بین آنزیم و مولکول‌های سوبسترا را کاهش می‌دهد و در نهایت سرعت هیدرولیز را کاهش می‌دهد و به فاز ثابتی می‌رسد که هیچ هیدرولیز ظاهری انجام نمی‌شود (Singh *et al.*, 2018). نتایج مشابهی از پژوهش‌های پیشین بر روی فرآیند هیدرولیز آنزیمی پروتئین نخود کاجان (Ranjbar Nadamani *et al.*, 2020) و پروتئین جگر (Maluf *et al.*, 2020) به دست آمده است.

اعتبارسنجی مدل

شرایط بهینه توسط نرم‌افزار Design Expert به دست آمد و بیشینه فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده هسته انار در دمای ۳۷/۶ درجه سانتی‌گراد با زمان واکنش ۱۳۶/۵۵ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترای ۲/۲ درصد (وزنی/وزنی) به دست آمد. مدل چند جمله‌ای مقادیر بهینه فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH و توان احیای آهن را در شرایط پیشنهادی پیش بینی نمودند. به منظور تایید شرایط پیشنهاد شده توسط معادله ریاضی، آزمایش‌های اضافی در شرایط پیش بینی شده توسط مدل اجرا گردید (در سه تکرار). نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۴ نشان داده شده است. پاسخ پیش بینی شده مدل مطابقت نزدیکی با داده‌های آزمایشی داشت. بنابراین، شرایط بهینه جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده با خواص آنتی‌اکسیدانی از هسته انار توسط روش سطح پاسخ تایید شد.

درجه هیدرولیز

درجه هیدرولیز شاخصی مهم در کنترل و ارزیابی میزان پیشرفت واکنش هیدرولیز پروتئین است و به طول زنجیر پروتئینی و میزان شکسته شدن پیوند پپتیدی بستگی دارد. به علاوه، درجه هیدرولیز با ساختار یا اندازه پپتید متناسب است و بر ایجاد توالی خاص اسیدهای آمینه، فعالیت زیستی و همچنین طعم پپتیدها تاثیر می‌گذارد (Cotabarren *et al.*, 2019; Fathi Akbarbaglu *et al.*, 2019; *et al.*, 2022).



شکل ۱- نمودار سطح پاسخ متغیرهای مستقل بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH (a, b, c) و قدرت احیا فریک (d, e, f)

Fig. 1- Response surface plots of independent variables on DPPH scavenging power (a, b, c) and on Reducing Power (d, e, f)

جدول ۴- داده‌های آزمایشی و پیش‌بینی شده فعالیت آنتی‌اکسیدانی در شرایط بهینه متغیرهای مستقل (۳ تکرار)

Table 4- Experimental and corresponding predicted values for Antioxidant activity using optimum values of independent variables (n = 3)

آنزیم Enzyme	دما Temperature ^{0}C	زمان Time min	نسبت آنزیم به سوبسترا E/S ratio %w/w	فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH DPPH scavenging power		قدرت احیای آهن Ferric reducing power	
				پیش‌بینی شده Predicted	آزمایشی Experimental	پیش‌بینی شده Predicted	آزمایشی Experimental
تریپسین Trypsin	48.8	136.55	2.2	87.35 ^{a}	87 ± 0.89 ^{a}	0.273 ^{b}	0.273 ^{b}

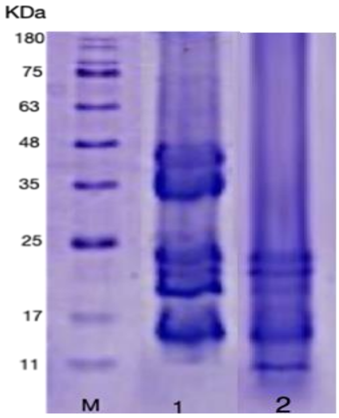
میانگین‌های دارای حروف مشترک ازنظر آزمون دانکن در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارد .

درجه هیدرولیز با الگوی شکست پیوند و ویژگی‌های آنزیم مورد استفاده در فرآیند هیدرولیز ارزیابی و تعیین می‌شود. فرآیند هیدرولیز معمولاً زمانی روی می‌دهد که آنزیم هیدرولیزکننده به پیوندهای قابل شکست در زنجیره پروتئینی دسترسی داشته باشد. همچنین میزان گرایش آنزیم به سوبسترا، شکل و ساختار مکان‌های فعال سوبسترا و نیز نحوه جهت‌گیری پیوند پپتیدی در تعیین میزان هیدرولیز و درجه آن موثر است (Mirzapour *et al.*, 2016). نتایج حاصل از هیدرولیز پروتئین هسته انار، درجه هیدرولیز ۱±۳۰/۱ درصد را نشان دادند. در طی فرآیند هیدرولیز پروتئین سبوس برنج توسط آلکالاز (Singh *et al.*, 2018) و پروتئین بذر کتان با استفاده از تریپسین (Akbarbaglu *et al.*, 2019) توسط نتایج مشابهی حاصل شد.

بررسی الگوهای توزیع وزن مولکولی با استفاده از الکتروفورز

با استفاده از تکنیک الکتروفورز SDS-PAGE، توزیع وزن مولکولی در پروتئین هسته انار و هیدرولیز شده‌های آن بررسی گردید. الگوی الکتروفورز پروتئین دناتوره شده هسته انار وجود باندهایی در محدوده ۱۵ تا ۷۵ کیلودالتون را نشان داد. بیشتر این باندها ترکیباتی با وزن مولکولی بالاتر از ۲۰ کیلودالتون هستند و دو باند قوی در محدوده ۲۰ تا ۲۵ کیلودالتون و ۳۵ تا ۴۸ کیلو دالتون هم شناسایی شدند (شکل ۲). پدیدارشدن باندهای پپتیدی با وزن مولکولی پائین و کمتر شدن شدت باندها و از بین بعضی از باندهای پپتیدی نشان از تاثیر آنزیم تریپسین بر پروتئین داشت. بررسی الگوی الکتروفورز پروتئین هیدرولیز شده، پپتیدهایی با وزن مولکولی کمتر از ۱۱

کیلودالتون را نشان داد. لازم به ذکر است که این روش قادر به شناسایی و جداسازی پپتیدهای با وزن مولکولی کمتر از ۱۱ کیلودالتون نبود. پژوهش‌گران دیگر نیز به نتایجی مشابه دست یافتند که نشان از توانایی هیدرولیز پروتئین با آنزیم تریپسین و تولید پپتیدهای کوچک بود (Mirzapour *et al*., 2016; Singh *et al*., 2018; Zang *et al*., 2019).



شکل ۲- الگوی الکتروفورز M:مارکر، 1: پروتئین هیدرولیز نشده 2: هیدرولیز شده‌ها

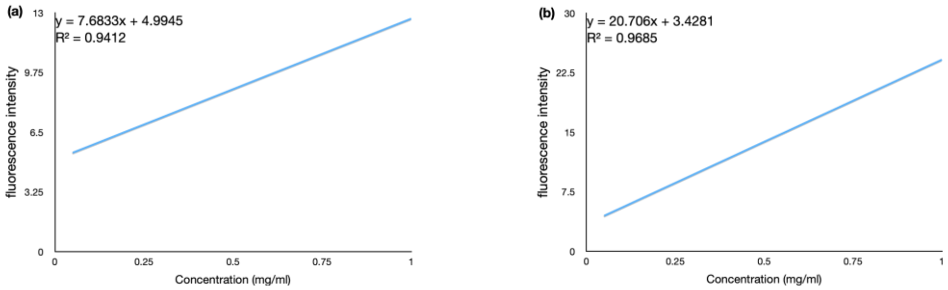
Fig. 2- The electrophoretic profiles of SDS-PAGE 1: Marker, 2: itact protein, 3: Protein hydrolysate

آبگریزی سطحی

آبگریزی یکی از مهم‌ترین فاکتورهای موثر در حلالیت مولکول‌های پروتئین در یک محلول است که در جریان واکنش‌های هیدرولیز آنزیمی به دلیل باز شدن مولکول و تغییر قرارگیری و دسترسی گروه‌های هیدروفوب در سطح مولکول مقدار آن تغییر خواهد کرد. در این رابطه استفاده از یک پروب فلورسنس جهت اتصال به گروه‌های آبگریز سطحی در اندازه‌گیری این ویژگی کاربرد دارد. در مطالعه حاضر از ترکیب (ANS) به عنوان پروب و از شدت شیب خطی فلورسنس در مقابل غلظت پروتئین به عنوان شاخص آبگریزی سطحی استفاده شد.

شکل ۳ نشان می‌دهد که شیب خط آبگریزی پروتئین هسته انار از شیب خط آبگریزی پروتئین هیدرولیز شده بیشتر است و بیانگر این است که فرآیند هیدرولیز آنزیمی توانست به طور معناداری منجر به افزایش آبگریزی سطحی نمونه‌ها و افزایش قرار گرفتن زنجیره‌های آبگریز در سطح مولکول شود.

نتایج مشابهی از تاثیر هیدرولیز آنزیمی بر آبگریزی پروتئین هسته گوجه (Meshginfar *et al*., 2019) و پروتئین گردو (Jin *et al*., 2020) مشاهده شد. پروتئین هسته انار آبگریزی کمی دارد. زیرا دارای پروتئین‌های دست‌نخورده و درهم پیچیده است. در چنین زنجیره پروتئینی، قسمت‌های آبگریز در مرکز و هسته زنجیره قرار گرفته‌اند و بدین شکل به پایداری ساختار کمک می‌نمایند. هیدرولیز آنزیمی می‌تواند با در دسترس قرار دادن گروه‌های پنهان شده در مرکز ساختار، بر آبگریزی سطحی تاثیرگذار باشد. در نتیجه، زمانی که زنجیره‌های پلی‌پپتیدی طی فرآیند هیدرولیز آنزیمی شکسته شوند، اسیدهای آمینه غیرقطبی در معرض محیط قرار گرفته و سبب افزایش میزان آبگریزی خواهند شد. همچنین هنگامی که اسیدهای آمینه بازی و اسیدی آبدوست در کنار یکدیگر قرار بگیرند، قادرند یکدیگر را به شکل الکترواستاتیکی خنثی نمایند و این فرآیند نیز در نهایت منجر به افزایش آبگریزی می‌شود. به علاوه، تصور می‌شود که توان پپتیدها در حذف رادیکال‌های آزاد با افزایش میزان آبگریزی افزایش یابد (Zang *et al*., 2019; Jin *et al*., 2020). نتایج حاصل از این بررسی نیز نشان داد که هیدرولیزهای پروتئینی از آبگریزی و قدرت ضداکسایش بیشتری در مقایسه با پروتئین دست‌نخورده برخوردارند.

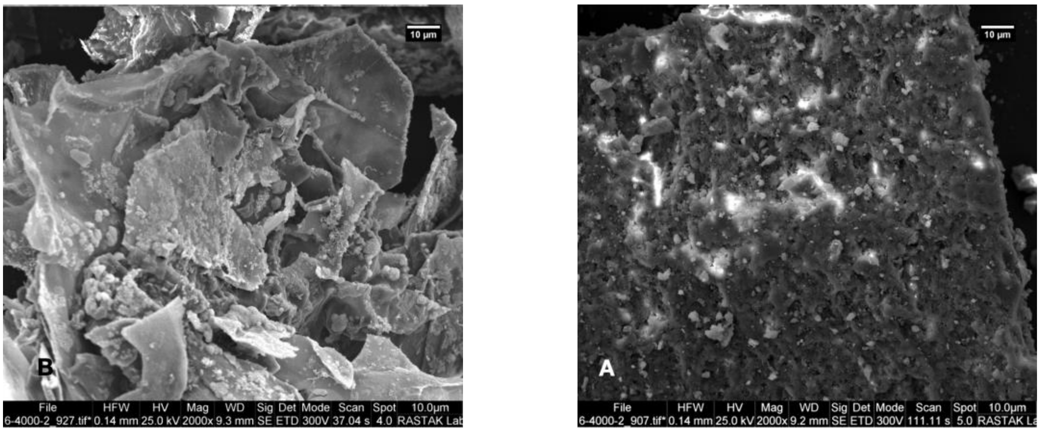


شکل ۳- شاخص آبگریزی سطحی براساس شدت فلورسنس در مقابل غلظت‌های متفاوت (a) پرتئین هیدرولیز تشده (b) هیدرولیزشده‌ها

Fig. 3- Surface hydrophobic index determined as relative fluorescence intensity versus different concentrations. (a) Unhydrolyzed protein. (b) hydrolysate.

تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی

در شکل ۴ تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی از دو نمونه هیدرولیز شده و هیدرولیز نشده دیده می‌شود. پروتئین هسته انار دارای ساختارهای پیچیده است که این ساختارها بعد از فرآیند هیدرولیز آنزیمی به قطعاتی کوچک و ساختاری بازتر همراه با چین‌های زیاد تبدیل می‌شود. نتایج به دست آمده از این مطالعه مطابق با سایر نتایج پژوهش‌های مشابه است که در آن‌ها تاکید شده که پروتئین به بخش‌های کوچکتری در طی فرآیند هیدرولیز آنزیمی تبدیل شده و در نتیجه ابعاد ذرات هیدرولیزهای آن هم پس از تیمار آنزیمی بسیار کاهش خواهد یافت (Jin *et al*., Islam *et al*., 2021; 2020).



شکل ۴- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از پروتئین هسته انار (A) و هیدرولیز شده‌های آن (B)

Fig. 4- Scanning electron microscope of pomegranate seed protein (A) and its hydrolysates (B)

نتیجه‌گیری

در این بررسی، هیدرولیز آنزیمی کنسانتره پروتئین هسته انار با استفاده از آنزیم تریپسین انجام شد. اثر متغیرهای مستقل بر فعالیت ضداکسایش توضیح داده شد. شرایط بهینه در جهت هیدرولیز پروتئین‌های هسته انار عبارتند از: دمای ۳۷/۶ درجه سانتی‌گراد، زمان انکوباسیون ۱۳۶/۵۵ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترا ۲/۲ درصد (وزنی/وزنی) برای آنزیم تریپسین که به شکل تجربی (آزمایشگاهی) هم تایید شد. درجه هیدرولیز در جهت تولید هیدرولیزهای پروتئینی تریپسین ۱±۳۰/۱ درصد برآورد شد. تراکم بیشتری از پپتیدهایی با وزن مولکولی کم (کمتر از ۱۱ کیلو دالتون) پس از گسست زنجیره‌های پروتئینی با وزن مولکولی بالا مشاهده شد. به کمک تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی روبشی، تجزیه پروتئین به قطعات کوچک‌تر تایید شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که فرآیند هیدرولیز قادر به تولید پپتیدهای زیست‌فعال با خواص ضداکسایشی و آبگریزی سطحی بالاتری است. بررسی‌های بیشتری باید در جهت جداسازی و شناسایی پپتیدها و ارزیابی احتمال کاربرد آن‌ها در مواد غذایی انجام شود.

منابع

1. Akbarbaglu, Z., Mahdi Jafari, S., Sarabandi, K., Mohammadi, M., Khakbaz Heshmati, M., & Pezeshki, A. (2019). Influence of spray drying encapsulation on the retention of antioxidant properties and microstructure of flaxseed protein hydrolysates. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 178*:* 421–429. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.03.038.
2. Aluko, R.E. (2015). Structure and function of plant protein-derived antihypertensive peptides. *Current Opinion in Food Science* 4: 44–50. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.05.002.
3. Chalamaiah, M., Yu, W., & Wu, J. (2017). Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins : a review. *Food Chemistry* 245: 205–222. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.087.
4. Cotabarren, J., Rosso, A.M., Tellechea, M., García-, J., Rivera, J.L., & Obregón, W.D. (2019). Adding value to the chia (*Salvia hispanica* L.) expeller: Production of bioactive peptides with antioxidant properties by enzymatic hydrolysis with Papain. *Food Chemistry* 274: 848–856. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.061.

5. Derakhshan, Z., Ferrante, M., Tadi, M., Ansari, F., Heydari, A., & Hosseini, M.S. (2018). Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of pomegranate peels, juice and seeds. *Food and Chemical Toxicology*. https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.023.
6. Fathi, M., Hosseini, F.S., & Rashidi, L. (2022). Optimized enzymatic hydrolysis of olive pomace proteins using response surface methodology. *Applied Food Biotechnology 9*(2): 79–90. https://doi.org/10.22037/afb.v9i2.36192.
7. Gerzhova, A., Mondor, M., Benali, M., & Aider, M. (2016). Study of total dry matter and protein extraction from canola meal as affected by the pH, salt addition and use of zeta-potential/turbidimetry analysis to optimize the extraction conditions. *Food Chemistry* 201: 243–252. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.074.
8. Hall, F., Johnson, P.E., Liceaga, A., & Johnson, P.E. (2018). Effect of enzymatic hydrolysis on bioactive properties and allergenicity of cricket (*Gryllodes sigillatus*) protein. *Food Chemistry*. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.058.
9. Hamzeh, A., Rezaei, M., Khodabandeh, S., Motamedzadegan, A., Noruzinia, M., & Regenstein, J. Mac. (2019). Optimization of antioxidant peptides production from the mantle of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) using RSM and fractionation. *Journal of Aquatic Food Product Technology 28*(4): 392–401. https://doi.org/10.1080/10498850.2019.1594480.
10. Houde, M., Khodaei, N., Benkerroum, N., & Karboune, S. (2018). Barley protein concentrates: Extraction, structural and functional properties. *Food Chemistry* 254: 367–376. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.156.
11. Islam, M.S., Hongxin, W., Admassu, H., Noman, A., Ma, C., & An wei, F. (2021). Degree of hydrolysis, functional and antioxidant properties of protein hydrolysates from Grass Turtle (*Chinemys reevesii*) as influenced by enzymatic hydrolysis conditions. *Food Science and Nutrition 9*(8): 4031–4047. https://doi.org/10.1002/fsn3.1903.
12. Jahanbani, R., Ghaffari, S.M., Salami, M., Vahdati, K., Sepehri, H., & Sarvestani, N.N. (2016). Antioxidant and anticancer activities of walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrolysates using different proteases. *Plant Foods for Human Nutrition 71*(4): 402–409. https://doi.org/10.1007/s11130-016-0576-z.
13. Jin, F., Wang, Y., Tang, H., Regenstein, J.M., & Wang, F. (2020). Limited hydrolysis of dehulled walnut (*Juglans regia* L.) proteins using trypsin: Functional properties and structural characteristics. *Lwt 133*(35): 110035. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110035.
14. Kato, A., & Nakai, S. (1980). Hydrophobicity determined by a fluorescence probe. *Biochimica et Biophysica Acta* 624: 13–20.
15. Kim, S.S., Ahn, C.B., Moon, S.W., & Je, J.Y. (2018). Purification and antioxidant activities of peptides from sea squirt (Halocynthia roretzi) protein hydrolysates using pepsin hydrolysis. *Food Bioscience* 25: 128–133. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.08.010.
16. Kurozawa, L.E., Park, K.J., & Hubinger, M.D. (2008). Optimization of the enzymatic hydrolysis of chicken meat using response surface methodology. *Journal of Food Science* 73(5). https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00765.x.
17. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature 227*(5259), 680–685. https://doi.org/10.1038/227680a0.
18. Maluf, J.U., Fiorese, M.L., Maestre, K.L., Dos Passos, F.R., Finkler, J.K., Fleck, J.F., & Borba, C.E. (2020). Optimization of the porcine liver enzymatic hydrolysis conditions. *Journal of Food Process Engineering 43*(4). https://doi.org/10.1111/jfpe.13370.
19. Meshginfar, N., Sadeghi, A., Farah, M., Tsopmo, A., Mahoonak, A.S., Hosseinian, F., & Tsopmo, A. (2019). Physicochemical, antioxidant, calcium binding, and angiotensin converting enzyme inhibitory properties of hydrolyzed tomato seed proteins. *Journal of Food Biochemistry 43*(2): 1–10. https://doi.org/10.1111/jfbc.12721.
20. Mirzapour, M., Rezaei, K., Sentandreu, M.A., & Moosavi-movahedi, A.A. (2016). In vitro antioxidant activities of hydrolysates obtained from Iranian wild almond (*Amygdalus scoparia*) protein by several enzymes. *International Journal of Food Sciences and Technology* 51: 609–616. https://doi.org/10.1111/ijfs.12996.
21. Nioi, C., Kapel, R., Rondags, E., & Marc, I. (2012). Selective extraction, structural characterisation and antifungal activity assessment of napins from an industrial rapeseed meal. *Food Chemistry 134*(4): 2149–2155. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.017.
22. Nourmohammadi, E., Sadeghimahoonak, A., Ghorbani, M., Alami, M., & Sadeghi, M. (2017). The optimization of the production of anti-oxidative peptides from enzymatic hydrolysis of Pumpkin seed protein. *Iranian Food Science and Technology Research Journal 13*(1): 14–26. https://doi.org/10.22067/ifstrj.v1395i0.45423.
23. Olivares-Galván, S., Marina, M.L., & García, M.C. (2020). Extraction and characterization of antioxidant peptides from fruit residues. *Foods 9*(8): 1018. https://doi.org/10.3390/FOODS9081018.
24. Ranjbar Nadamani, E., Sadeghi Mahoonak, A., Ghorbani, M., Jakobson, S., & Khori, V. (2020). Optimization of Cajanus Cajan's antioxidant and nutritional characteristics during hydrolysis process by pepsin using response

surface method. *Iranian Food Science and Technology Research Journal 15*(5): 583–596. https://doi.org/10.22067/ifstrj.v15i4.76968.

25. Singh, T.P., Siddiqi, R.A., & Sogi, D.S. (2018). Statistical optimization of enzymatic hydrolysis of rice bran protein concentrate for enhanced hydrolysate production by papain. *LWT - Food Science and Technology*. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.014.
26. Talekar, S., Patti, A.F., Singh, R., Vijayraghavan, R., & Arora, A. (2018). From waste to wealth : High recovery of nutraceuticals from pomegranate seed waste using a green extraction process. *Industrial Crops & Products* 112*:* 790–802. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.12.023.
27. Tehranifar, A., Zarei, M., Nemati, Z., Esfandiyari, B., & Reza, M. (2010). Investigation of physico-chemical properties and antioxidant activity of twenty Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae 126*(2): 180–185. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.07.001.
28. Wang, D., & Shahidi, F. (2018). Protein hydrolysate from turkey meat and optimization of its antioxidant potential by response surface methodology. *Poultry Science 97*(5): 1824–1831. https://doi.org/10.3382/ps/pex457.
29. Xie, J., Du, M., Shen, M., Wu, T., & Lin, L. (2019). Physico-chemical properties, antioxidant activities and angiotensin-I converting enzyme inhibitory of protein hydrolysates from Mung bean (*Vigna radiate*). *Food Chemistry 270*(235): 243–250. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.103.
30. Zang, X., Yue, C., Wang, Y., Shao, M., & Yu, G. (2019). Effect of limited enzymatic hydrolysis on the structure and emulsifying properties of rice bran protein. *Journal of Cereal Science* 85: 168–174. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.09.001.